

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JP99/388

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1998年 9月30日

REC'D 23 MAR 1999

WIPO

PCT

出願番号
Application Number:

平成10年特許願第277361号

出願人
Applicant(s):

理化学研究所
間 陽子
蒲田 政和

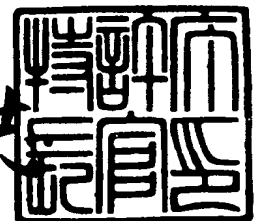
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 3月 5日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平11-3011094

【書類名】 特許願

【整理番号】 98220M

【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特許出願

【提出日】 平成10年 9月30日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明の名称】 アポトーシス誘導剤

【請求項の数】 3

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市松代4丁目21番2号 シャレールつくば3-105

 【氏名】 間 陽子

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市高野台3-10-24 グリーンヒルサイド桧山203

 【氏名】 蒲田 政和

【特許出願人】

 【識別番号】 000006792

 【氏名又は名称】 理化学研究所

【特許出願人】

 【識別番号】 598122278

 【氏名又は名称】 間 陽子

【特許出願人】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市高野台3-10-24 グリーンヒルサイド桧山203

 【氏名又は名称】 蒲田 政和

【代理人】

 【識別番号】 100092635

 【弁理士】

【氏名又は名称】 塩澤 寿夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100096219

【弁理士】

【氏名又は名称】 今村 正純

【選任した代理人】

【識別番号】 100095843

【弁理士】

【氏名又は名称】 釜田 淳爾

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 007663

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9607613

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 アポトーシス誘導剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 HIV-1のvpr遺伝子がコードするVpr蛋白質のC末端側から15個のアミノ酸残基が欠失した蛋白質を含むアポトーシス誘導剤。

【請求項2】 請求項1に記載の蛋白質のアミノ酸配列において数個のアミノ酸が置換、挿入、及び／又は欠失しており、実質的にG2期停止能を有せず、かつアポトーシス誘導活性を有する蛋白質を含むアポトーシス誘導剤。

【請求項3】 請求項1又は2に記載の蛋白質をコードするアポトーシス誘導遺伝子。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はアポトーシス誘導作用を有する蛋白質及び該蛋白質をコードする遺伝子に関するものである。

【従来技術】

アポトーシス (Apoptosis) は、物理的外傷や化学的毒物などにより生じる壊死 (Necrosis) とは異なり、生理学上の種々の条件下で生じる細胞死であり (Kerr, J. F. and Wyllie, A.H., Br. J. Cancer, 26, pp.239-257, 1972)、プログラム細胞死 (Programmed Cell Death) とも呼ばれる。アポトーシスは、細胞障害性T細胞による細胞障害、放射線照射、腫瘍壊死因子 (TNF) などのサイトカイン類、抗CD3抗体などによって誘導されるほか、悪性腫瘍の自然退縮においても確認されている。細胞のアポトーシスを人為的に誘導する遺伝子や遺伝子産物を用いることにより、遺伝子治療や特定の癌細胞の破壊などが可能になると期待される。

【0002】

一方、ヒト後天性免疫不全症候群 (AIDS) の原因ウイルスであるヒト後天性免疫不全症ウイルス1型 (HIV-1) は、構造遺伝子及び調節遺伝子に加え、自身の複製に必須ではないアクセサリー遺伝子 (nef, vpr, vpu, vif) を有している。アクセサリー遺伝子の一つであるvprの遺伝子産物 (蛋白質Vpr) は、ウイルス感染

効率の上昇及びHIV潜伏感染細胞からのウイルス産生を惹起するなど、AIDS発症のキーファクターとして注目されている。さらに、蛋白質Vprは、細胞の増殖抑制、分化誘導、アポトーシス誘導、アポトーシス抑制、核の多倍体化誘導などの極めて多様な生理作用を有することも明らかにされている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題及び課題を解決するための手段】

本発明の課題は、アポトーシス誘導作用を有する遺伝子及びその遺伝子産物を提供することにある。本発明者は上記の課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、HIV-1のアクセサリ-遺伝子vprがコードする96アミノ酸からなるVpr蛋白質のカルボキシル末端の15アミノ酸残基を欠失した変異体が、極めて高いアポトーシス誘導活性を有しており、その結果として細胞増殖抑制作用を発揮することを見出した。本発明はこの知見を基にして完成されたものである。

【0004】

すなわち本発明は、HIV-1のvpr遺伝子がコードするVpr蛋白質のC末端側から15個のアミノ酸残基が欠失した蛋白質を含むアポトーシス誘導剤を提供するものである。本発明の別の態様によれば、上記の蛋白質のアミノ酸配列において数個のアミノ酸が置換、挿入、及び／又は欠失しており、かつアポトーシス誘導活性を有する蛋白質を含むアポトーシス誘導剤が提供される。また、本発明により、上記の各蛋白質をコードするアポトーシス誘導遺伝子が提供される。別の観点からは、上記の蛋白質又は上記の遺伝子を用いて細胞のアポトーシスを誘導する方法；上記の遺伝子を含む組換えベクター；上記の組換えベクターを用いて細胞のアポトーシスを誘導する方法が提供される。

【0005】

【発明の実施の形態】

本発明の蛋白質は、HIV-1のvpr遺伝子がコードするVpr蛋白質において、C末端側から15個のアミノ酸残基が欠失した81アミノ酸残基からなる蛋白質である（以下、本明細書においてこの蛋白質を「C81変異蛋白質」と呼ぶ場合がある）。このC81変異蛋白質は実施例に記載した方法に従って容易に製造することができる。C81変異蛋白質は、HIV-1のvpr遺伝子の核酸配列又はVpr蛋白質のアミノ酸配列

(Adachi, A. et al., J. Virol., 59, pp.284-291, 1986) を利用することによっても製造可能である。

【0006】

C81変異蛋白質のアポトーシス誘導作用は、本明細書の実施例に具体的かつ詳細に記載された方法に従って容易に確認することができる。本発明のC81変異蛋白質は、Vpr蛋白質に比べてアポトーシス誘導作用が著しく高められていることを特徴としている。本発明のC81変異蛋白質の高められたアポトーシス誘導作用は、本明細書の実施例の方法に従って当業者が容易に確認することができる。また、本発明の蛋白質は、Vpr蛋白質と異なり、実質的にG2期停止 (arrest) 能を有しないことを特徴としている。

【0007】

上記のC81変異蛋白質のアミノ酸配列において、数個のアミノ酸残基が置換、挿入、及び／又は欠失したアミノ酸配列を有し、C81変異蛋白質と同様のアポトーシス誘導作用を有する蛋白質（以下、「改変蛋白質」と呼ぶ場合がある）も本発明の範囲に包含される。本発明の遺伝子はC81変異蛋白質又は上記改変蛋白質をコードする核酸配列からなり、DNA配列又はRNA配列のいずれをも包含するが、これらは上記文献記載の方法に従って容易に入手することが可能である。

【0008】

上記の改変蛋白質は、C81変異蛋白質のアミノ酸配列をコードするDNAを有する大腸菌などをN-ニトロ-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンなどの薬剤を用いて突然変異処理し、菌体から改変蛋白質をコードする遺伝子を回収した後、通常の遺伝子発現操作を行うことによって製造できる。また、前記遺伝子を亜硫酸ナトリウムなどの薬剤で直接処理するか、あるいは部位特異的変異法 (Kramer, W. et al., Methods in Enzymology, 154, 350, 1987) やリコンビナントPCR法 (PCR Technology, Stockton press, 1989) などの手法によってヌクレオチドの欠失、置換、又は付加を直接導入してもよい。

【0009】

本発明の蛋白質はアポトーシス誘導剤として有用である。例えば、癌細胞においてアポトーシスを誘導し、癌細胞を死滅させるための医薬として用いることがで

きる。さらに、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）潜伏感染細胞の排除、及び該技術の開発にも有用である。このような目的のために、本発明の蛋白質は、他のポリペプチドと融合されていてもよい。本発明の蛋白質のアミノ酸配列を部分配列として含む融合蛋白質、及び該融合蛋白質をコードする遺伝子も本発明の範囲に含まれる。例えば、癌細胞などの標的細胞に対して特異的なモノクローナル抗体やそのフラグメントとの融合蛋白質を製造することにより、標的細胞において特異的にアポトーシスを惹起させることが可能になる。また、本発明の蛋白質は、アポトーシス耐性が関与する疾患などの治療への有用性が期待され、生化学、遺伝子工学などの分野における試薬としても有用である。

【0010】

本発明の遺伝子は、本発明の蛋白質の製造に有用であるほか、アポトーシス耐性が関与する疾患に対する遺伝子治療に用いることができる。遺伝子治療の方法は特に限定されないが、通常は、本発明の遺伝子をベクターに組み込み、生体内に該組換えベクターを導入して本発明の遺伝子を発現させればよい。生体内に遺伝子を導入するためのベクターは種々知られており、当業者は適宜のベクターを選択することができる。また、特定の細胞において遺伝子の発現を制御するための手法も当業者に利用可能である。そのほか、本発明の遺伝子をHIV-1 LTRの下流に連結し、抗HIV gp120抗体結合リポソームに封入して生体内に導入することにより、HIV感染細胞を直接的かつ特異的に破壊することが可能である。

【0011】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

1. 材料と方法

HIV-1感染性DNAクローンpNL432のvpr遺伝子断片の5'端にFlag配列を連結後、高度発現ベクターpME18neoに挿入した。以下、これらの手順を説明する。

(1) C81変異蛋白質をコードする遺伝子（以下、「C81変異遺伝子」と呼ぶ。）の増幅用に設計したプライマーは以下の通りである。

Sense Primer: 5'-GAAGATATCCGAACAAGCCCCAGAAGAC-3'

Anti-sense Primer: 5'-GGTCTAGATCATATTCTGCTATGTCGACAC-3'

接着配列に加え、senseプライマーの5'端にはFlag-Tag接続のためのEcoRVsiteを、antisenseプライマーの3'端にはサブクローニングベクター接続のためのXbaI siteを付加した(酵素サイトは下線で示す)。このプライマーを用いてHIV-1分離株NL43の感染性DNAクローンpNL432 (Adachi, A. et al., J. Virol., 59, pp.284-291, 1986) を鋳型としたPCR法を行い、C81変異遺伝子断片を増幅した。

【0012】

(2) 鋳型DNA 1 μ g、PCR緩衝液(10mM Tris-HCl pH8.3、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.001% gelatin)、0.2mM dNTP、プライマー各 50pmolおよびAmpli Taq polymerase (Perkin Elmer Cetus) 2.5 unitsを含む反応液中で94℃で5分間熱変性後、94℃で1分、54℃で1分、72℃で2分の増幅処理を35回行い、72℃で10分の伸長反応を行った。得られたPCR産物は、EcoRV およびXbaIで4時間以上処理後、アガロースゲル電気泳動によりDNAを分画後、GENECLEAN II KITを用いて目的DNA断片を溶出、精製した。

【0013】

(3) 次に、増幅断片とFlag-Tag配列とを接続するため、PCR増幅vpr遺伝子断片をあらかじめFlag-Tagを接続しEcoRVおよびXbaI処理されたpBluescript SK+-IIベクターにライゲートした後、大腸菌コンピテントセルXLI-Blueに形質転換した。次に、Fvpr/pBluescript SK+-IIからNotIおよびXhoI切断部位でC81変異遺伝子のDNA断片を切り出し、GENECLEAN II KITを用いて目的DNA断片を溶出し、pME18Neoにライゲートし、XLI-Blueに導入して形質転換細胞を得た。プラスミドDNAはSDS法により調製し、塩化セシウム平衡密度勾配遠心法を用いて精製した。

これと野生型及びコントロールベクターをエレクトロポレーション法にてHeLa細胞に導入した。細胞増殖に及ぼす効果をコロニー形成法により解析した。導入12時間後に5 \times 10⁵個の細胞を10 cmシャーレに蒔き、G418を含む選択培地にて12日間培養し、メタノール固定後にギムザ染色を行い、コロニー数を算出した。この時、 β -Gal染色を用いて各変異体につき導入効率を算出し、コロニー数を補正した。細胞周期はフローサイトメトリー法により解析した。

【0014】

C81変異遺伝子発現プラスミドをGFP発現プラスミドと一過性に共導入し、48時間後に細胞を1%ホルムアミド/PBSに続いて70%メタノールを用いて固定後、PI染色液で染色してFACS解析した。GFPの蛍光をマーカーとしてC81変異遺伝子導入細胞と非導入細胞を選別し、各分画のDNA含量を調べた。この時、+、野生型と同等のG2期停止能を持つ；±、野生型より弱い；-、持たない、として区分した。同様に、導入48時間後に抗Flag抗体あるいは抗ミニクロモソームメンテナンス(MCM)抗体で二重蛍光染色し共焦点レーザー顕微鏡で観察した。MCM陰性：G2期細胞と判定した。

【0015】

増殖している細胞の検出のため、細胞をブロモデオキシウリジン(BrdU)存在下で30分間培養後、抗BrdU抗体で蛍光染色した。さらに、導入48時間後、ビオチン標識アネキシンV及びPE標識ストレプトアビジンで蛍光染色した。GFP陽性細胞をC81変異遺伝子導入細胞のマーカーとして共焦点レーザー顕微鏡で観察した。アネキシンV陽性：アポトーシス誘導細胞と判定した。

【0016】

2. 結果

Vpr蛋白質のC末端から15アミノ酸残基を欠失したC81変異蛋白質をコードするC81変異遺伝子を導入したHeLa細胞では、G2期停止が起こらないにも関わらず、コロニー形成能がコントロールベクター導入細胞より約30%低下していた。また、C末端欠失vpr導入細胞におけるBrdUの取り込みは、コントロール導入細胞と比較して顕著に低下していた。さらに、細胞をG2期マーカーであるMCMに対する抗血清を用いて蛍光染色した結果、この細胞増殖抑制活性がG2期停止によるものではないことが明らかとなった。

【0017】

以上の結果から、C末端欠失Vpr導入細胞ではG2期停止とは異なる機序によって細胞増殖が著しく低下していることが確認された。そこで、アネキシン-Vビオチンによる細胞染色を行ったところ、C末端欠失Vprではアポトーシス細胞の割合が野生型Vprに比べ顕著に、また早く増加していた。Vpr蛋白質のカルボキシル末端の15アミノ酸残基を欠失した変異体は、著しく高いアポトーシス活性を誘導するこ

とが明らかとなった。

【0018】

【表1】

| 検査項目 | 発現ベクター導入細胞の性状 | | |
|---|---------------|-------|------------|
| | C81 変異体 | 野生体 | コントロールベクター |
| G2 期停止 ¹⁾ | — | + | — |
| 抗-MCM 抗体による蛍光染色陽性細胞の% ²⁾ | 63.6% | 18.3% | 80.0% |
| コロニー形成能 ³⁾ | 72.8% | 7.6% | 100.0% |
| BrdU を取り込んだ細胞の% ⁴⁾ | 20.1% | 19.5% | 34.8% |
| アネキシン-V ビオチンによる細胞染色陽性細胞の% ⁵⁾ | 20.7% | 1.4% | 1.3% |

¹⁾ +、野生型と同等の G2 期停止能を有する；±、野生型より弱い；

—、G2 期停止能を有しない

²⁾ MCM 陰性：G2 期細胞

³⁾ β -Gal 染色を用いて各変異体につき導入効率を算出しコロニー数を補正し、コントロールベクター導入細胞のコロニー数を 100 として%で表示した

⁴⁾ 抗 BrdU 抗体陽性：増殖細胞

⁵⁾ アネキシン V 陽性：アポトーシス誘導細胞

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 アポトーシス誘導作用を有する遺伝子及びその遺伝子産物を提供する

。 【解決手段】 HIV-1のvpr遺伝子がコードするVpr蛋白質のC末端側から15個のアミノ酸残基が欠失した蛋白質を含むアポトーシス誘導剤、及び該蛋白質をコードするアポトーシス誘導遺伝子。

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000006792
【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号
【氏名又は名称】 理化学研究所

【特許出願人】

【識別番号】 598122278
【住所又は居所】 茨城県つくば市松代 4 丁目 2 1 番 2 号 シャレール
つくば 3-105
【氏名又は名称】 間 陽子

【特許出願人】

【識別番号】 598133609
【住所又は居所】 茨城県つくば市高野台 3-10-24 グリーンヒル
サイド 松山 203
【氏名又は名称】 蒲田 政和

【代理人】

申請人

【識別番号】 100092635
【住所又は居所】 東京都中央区京橋一丁目 5 番 5 号 KRFビル 5 階
塩澤・今村特許事務所
【氏名又は名称】 塩澤 寿夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100096219
【住所又は居所】 東京都中央区京橋一丁目 5 番 5 号 KRFビル 5 階
塩澤・今村特許事務所
【氏名又は名称】 今村 正純

【選任した代理人】

【識別番号】 100095843
【住所又は居所】 東京都中央区京橋一丁目 5 番 5 号 KRFビル 5 階
塩澤・今村特許事務所
【氏名又は名称】 釜田 淳爾

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006792]

| | |
|----------|--------------|
| 1. 変更年月日 | 1990年 8月28日 |
| [変更理由] | 新規登録 |
| 住 所 | 埼玉県和光市広沢2番1号 |
| 氏 名 | 理化学研究所 |

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [598122278]

1. 変更年月日 1998年 9月 7日

[変更理由] 新規登録

住 所 茨城県つくば市松代4丁目21番2号 シャレールつくば3-105

氏 名 間 陽子

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [598133609]

1. 変更年月日 1998年 9月30日

[変更理由] 新規登録

住 所 茨城県つくば市高野台3-10-24 グリーンヒルサイド
山203

氏 名 蒲田 政和

THIS PAGE BLANK (USPTO)